На правах рукописи

ЕГОРОВ

Владимир Валерьевич

СТРУКТУРНЫЕ ПРЕДПОСЫЛКИ АМИЛОИДОГЕННОСТИ МОДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ.

Специальность 03.00.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2007

Работа выполнена в Отделе молекулярной генетики ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН», Санкт-Петербург

Научный руководитель
доктор медицинских наук Михаил Михайлович Шавловский

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, профессор Владимир Николаевич Кокряков

кандидат биологических наук Андрей Николаевич Савельев

Ведущее научное учреждение: ГосНИИ Особо чистых биопрепаратов

Защита состоится 2007 г. в часов на заседании Диссертационного совета Д.001.022.03 при ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН» по адресу: 197376 Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН» по адресу: 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12.

Автореферат разослан 2007 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Пучкова Л.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Конформационные заболевания - это группа заболеваний, при которых нарушение нормальных физиологических и появление аномальных свойств белков связаны с изменением их пространственной структуры (*Merlini, Belotti, 2003*). Значительная часть конформационных болезней представляет собой различные типы амилоидозов. Возникновение амилоидозов связано с накоплением в различных органах и тканях нерастворимых фибриллярных форм белков. К амилоидозам относятся такие известные заболевания как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, прионные заболевания. При диабете типа 2 образование амилоида также является одним из звеньев патогенеза (*Покровский и др., 2004*). Амилоидозы являются довольно распространенной группой заболеваний. Так, например, в настоящее время, болезнь Альцгеймера обнаружена у 12 млн. людей по всему миру (*Merlini, Belotti, 2003*). По различным данным, амилоидоз мозга гистохимически выявляется у 30-46% психически здоровых людей в возрасте старше 60 лет и у 80-100% людей старше 85 лет (*Ойфа, 1987; Merlini, Belotti, 2003*). Несмотря на существенный прогресс в понимании механизмов формирования амилоидных отложений, до сих пор не существует эффективных средств для лечения амилоидозов. (*Jakobson, 2004*). Широкая распространенность этой группы заболеваний позволяет рассматривать проблему поиска ингибиторов фибриллогенеза как достаточно актуальную. Изучение аномального фибриллогенеза является важным также и для разработки новых наноматериалов на основе аномальных фибрилл (*Mitraki et al., 2005; Velikov, 2005*).

Цели исследования. Основной целью данной работы являлось изучение молекулярных механизмов аномального фибриллогенеза и разработка подходов для подавления амилоидогенности модельных белков.

Задачи исследования.

1. Провести анализ первичной структуры известных фибриллогенных пептидов *in silico*. Выявить закономерности первичной структуры, характерные для этой группы полипептидов.
2. Определить структуру потенциальных фибриллогенных детерминант модельных белков альфа-лактальбумина и лизоцима.
3. Разработать и синтезировать пептид, содержащий потенциальную фибриллогенную детерминанту альфа-лактальбумина человека. Изучить фибриллогенные свойства такого пептида *in silico* и *in vitro*. Изучить влияние такого пептида на фибриллогенез альфа-лактальбумина.
4. Установить возможный механизм участия потенциальных амилоидогенных детерминант в фибриллогенезе.

5. Разработать и синтезировать пептид, потенциально способный влиять на фибриллогенез лизоцима куриного яйца. Изучить его влияние на фибриллогенез этого белка.

6. Предложить возможные пути ингибирования фибриллогенеза и образования токсичных для клеток олигомеров белков.

Научная новизна полученных результатов. При анализе первичной структуры фибриллогенных пептидов впервые обнаружено наличие зеркально-симметричных мотивов. Впервые предложен и синтезирован способный к фибриллогенезу пептид, гомологичный фрагменту альфа-лактальбуминов. С помощью компьютерного моделирования и изучения свойств фибрилл такого пептида охарактеризован механизм его фибриллогенеза. Показано влияние такого пептида на фибриллогенез альфа-лактальбумина. Установлена роль участка последовательности 35-51 а.о. в фибриллогенезе этого белка. Предложена стратегия для ингибирования образования префибриллярных форм белков. Установлен потенциальный механизм участия зеркально-симметричных мотивов в фибриллогенезе. На основании такого механизма разработан и синтезирован пептид, идентичный участку последовательности лизоцима и способный оказывать влияние на фибриллогенез этого белка.

Научная и практическая значимость работы. Полученные результаты позволяют расширить представления о мотивах, участвующих в белок-белковых взаимодействиях, необходимых для аномального фибриллогенеза и

предложить стратегию для создания пептидов, способных влиять на процессы, сопровождающие аномальный фибриллогенез белков. В будущем это может послужить основой для создания терапевтических средств для борьбы с амилоидозами. Кроме того, полученные данные и разработанные методы моделирования *in silico* могут быть использованы для создания наноматериалов на основе фибриллогенных пептидов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В последовательностях модельных белков альфа-лактальбумина и лизоцима обнаружены зеркально-симметричные мотивы.

2. Показано, что пептид GYDTQAIVENNESTEYG, содержащий зеркально-симметричный мотив и совпадающий по первичной структуре с участком 35-51 а.о. бета-домена альфа-лактальбумина, содержит фибриллогенную детерминанту этого белка.

3. Пептид GYDTQTVVNNNGHTDYG, гомологичный зеркально-симметричному мотиву альфа-лактальбумина, также содержит фибриллогенную детерминанту этого белка и способен связываться с ним в соотношении 2:1.

4. Результаты компьютерного моделирования фибриллогенеза пептида GYDTQTVVNNNGHTDYG, подтверждены в экспериментах *in vitro*.

5. Предложен механизм участия зеркально-симметричных мотивов в фибриллогенезе белков. На основании предложенного механизма разработан пептид, способный влиять на аномальный фибриллогенез лизоцима.

Апробация результатов работы. Основные положения работы были представлены на 9-й и 10-й Пущинских международных школах-конференциях молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пущино, 2005, 2006), на международных конференциях European Society of Human Genetics (Prague, Czech Republic, 2005, Amsterdam, The Netherlands, 2006), на 8- и 9-й Всероссийских медико-биологических конференциях молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2005, 2006) на научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург, 2005), на межвузовской научной конференции "XXXIV неделя науки СПбГТУ" (Санкт-Петербург, 2005), а также на конференции, посвященной 115-летию ГУ НИИЭМ РАМН (Санкт-Петербург, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 2 статьи и 7 тезисов на Всероссийских и Международных конференциях.

Личный вклад соискателя. Соискателем были проведены: анализ литературы по теме исследования, планирование экспериментов, получение основной части результатов, написание статей и подготовка докладов на конференциях. Выделение и очистка белка, используемого в работе, получение фибрилл, подготовка образцов для электронной микроскопии, модификация существующих методов для атомной силовой микроскопии образцов, оптимизация условий для флуоресцентного анализа, электрофоретическое и хроматографическое разделение олигомерных форм белков. Также соискателем была осуществлена разработка алгоритмов оригинальных компьютерных программ, использованных в работе. Отработка алгоритмов и написание программ осуществлялись студентом Кафедры биофизики СПбГПУ Гармаем Ю.П. Электронная микроскопия проводилась в Лаборатории морфологии вирусов ГУ НИИ гриппа РАМН под руководством Сироткина А.К. и в Ботаническом институте РАН. Атомная силовая микроскопия осуществлялась в Лаборатории биофизики макромолекул ОМРБ ПИЯФ РАН под руководством Лебедева Д.В. Измерение спектров флуоресценции осуществлялось в ИВС РАН под руководством Паутова В.Д., в Отделе биохимии НИИЭМ РАМН под руководством Лозовского В.Т., а также в ИНЦ РАН под руководством Туроверова К. К. Измерение ферментативной активности лизоцима проводилось в Отделе общей патологии НИИЭМ РАМН под руководством Берлова М.Н.

Структура диссертации. Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и

обсуждение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы», включающий 120 иностранных и 18 отечественных источников. Диссертация изложена на 107 стр. Результаты представлены в 1 таблице и иллюстрированы 45 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. При выполнении работы использовали реактивы фирм «SIGMA» (Тиофлавин Т, NaN_3, EDTA, фенил-сефароза, маркеры молекулярного веса, лизоцим куриного яйца, препарат клеточной стенки *M. luteus*), «SERVA» (реактивы для электрофореза и буферные растворы), «TOYOSODA» (смолы для гель-фильтрации), «MERCK» (неорганические соли). Пептиды GYDTQTVVNNNGHTDYG (далее - **ID**), GYDTQAIVENNESTEYG(далее - **WT**) и NTQATNRNTD(далее - **HALF**) были синтезированы в ООО «НПФ «Верта», чистота препаратов превышала 90%. Для фильтрации образцов перед выполнением сканирующей зондовой микроскопии использовали фильтры фирмы «Orange scientific». Для сканирующей зондовой микроскопии использовали пластинки слюды фирмы «Structure Probe Inc.» и кантиливеры фирмы «NT-MDT». Также использовали стеклянные пластинки, покрытые HydroGel фирмы «Perkin-Elmer». Аминокислотные последовательности фибриллогенных пептидов и белков получены из баз данных GenBank, SWISS-PROT, а также из статей (*Azriel, Gazit, 2001; Liu et al., 2004; Tagliavini et al., 1993; Sedman et al., 2005; Jarvis et al., 1993; Krebs et al., 2000; Lopez de la Paz, 2002; Legman et al., 2004; Nelson et al., 2005*).

Выделение альфа-лактальбумина человека из молока. Альфа-лактальбумин (АЛ) выделяли из молока человека по методу, описанному в работе (*Svensson et al., 2000*). Контроль чистоты препарата проводили с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

Электрофорез белков в ПААГ. ***А. Электрофорез в денатурирующих условиях (Laemmli, 1970).*** Пробы для электрофореза готовили следующим образом: к 5 мкл белка с концентрацией около 1 мг/мл добавляли 5 мкл раствора, содержавшего 2% SDS, 2.5% бета-меркаптоэтанол и 0,01% бромфеноловый синий, затем инкубировали на кипящей водяной бане в течение 3 минут. Электрофорез белка в 8% ПААГ осуществляли в пластинах с размерами 10×10 см при градиенте напряжения 20 В/см в геле следующего состава: 8% акриламид (акриламид/метиленбисакриламид=29:1), 37мМ Tris-HCl, pH 9.4, 0.01% SDS, 0.01% персульфат аммония, 0.001% тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) с использованием электродного буфера, содержащего 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8 и 0.1% SDS.

Б. Диск-электрофорез в кислой системе (Маурер, 1971). К 3 мкл образца (15 мкг белка) добавляли 1 мкл буфера (60мМ KOH-CH_3COOH буфер, pH 6.7, 50% глицерин, 0.001% метиловый зеленый, 10% насыщенный спиртовой р-р пиронина G). Электрофорез лизоцима,

инкубировавшегося с пептидом и без пептида проводили с использованием 7.5% разделяющего ПААГ, содержащего КОН-CH_3COOH буфер, pH 4.3 (70мМ КОН, 2.5% CH_3COOH, 7.5% акриламид (акриламид/метиленбисакриламид=29:1), 0.01% персульфат аммония, 0.001% ТЕМЕД) и 5% концентрирующего ПААГ содержащего Tris-HCl буфер, pH 6.7 (40мМ КОН, 0.2% CH_3COOH, 5% акриламид (акриламид/метиленбисакриламид=29:1), 0.01% персульфат аммония, 0.001% ТЕМЕД). В качестве электродного использовали β-аланин-ацетатный буфер, pH 4.5 (β-аланин – 31.2 г, CH_3COOH - 8.01 мл, H_2O - до 1 л). Непосредственно перед употреблением исходный электродный буфер разводили в 10 раз дистиллированной водой. Электрофорез проводили в течение 3 часов при градиенте потенциала 15-20 В/см в аппарате для вертикального ЭФ.

Окрашивание белков в ПААГ с помощью нитрата серебра. После проведения электрофореза гель помещали на 1 час в 50 мл раствора для отмывки от SDS (50 мл 96% этанола, 10 мл ледяной уксусной кислоты, 40 мл дистиллированной воды). При изучении электрофоретического разделения олигомеров пептида в 50 мл раствора добавляли также формальдегид до конечной концентрации 1% для фиксации мономеров пептида в геле. Затем помещали гель на 30 минут в 10% раствор (v/v) уксусной кислоты, после чего промывали гель дистиллированной водой 3 раза по 2 минуты. Помещали гель в 0.1% раствор $AgNO_3$ на 30 минут. Промывали гель дистиллированной водой в течение 20 секунд и помещали в проявитель (3% соды безводной, 0.1% формальдегида, 0.0001% тиосульфата Na). После проявления зон фиксировали гель в 10% растворе уксусной кислоты.

Сканирующая зондовая (атомная силовая) микроскопия. Атомную силовую микроскопию (АСМ) проводили на микроскопе «Solver-bio» (NT-MDT, Зеленоград), смонтированном на флуоресцентном микроскопе «Olympus». Сканирование проводили в полуконтактном режиме с использованием кантиливера NSG 01-03. Для сорбции образцов использовали поверхности только что отщепленной от блока слюды, поверхность слюды, покрытой углеродной пленкой и поверхность гидрогеля. Для изучения структуры протофиламентов использовали предварительную фильтрацию образцов через фильтр с размерами пор 0.2-0.4 мкм.Измерения параметров фибрилл проводили с помощью пакета программ NT-MDT Nova.

Гель-фильтрация. Гель-фильтрацию олигомеров пептида **ID** осуществляли на колонке 1,5×15 см с TOYOPEARL HW-50, уравновешенной буфером 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 NaCl. Для предотвращения фиксации на колонке высокомолекулярных агрегатов пробу предварительно центрифугировали в течение 10 минут на центрифуге «Eppendorf» при 13400 об/мин. Супернатант наносили на колонку при скорости элюирования 1 мл/мин. Регистрацию проводили с помощью системы Uvicord фирмы LKB. Колонка калибровалась с

помощью стандартного набора белков известной молекулярной массы. Калибровочный график строили с использованием метода линейной регрессии, реализованного в пакете программ SigmaPlot.

Поиск мотивов в аминокислотных последовательностях. Для поиска симметричных участков в протяженных последовательностях использовали оригинальную программу, написанную на языке С. С помощью этой программы осуществлялся поиск соответствия между всеми возможными участками в последовательности, записанной в направлении N-конец – С-конец и участками той же последовательности, записанными в обратном направлении. Для поиска симметрии все аминокислотные остатки разбивали на 4 группы - заряженные положительно (H, R, K), заряженные отрицательно (E, D), полярные (Q, N, T, H, R, K, E, D), гидрофобные (Y,A,L,W,G,I,V). Считали, что последовательность симметрична в случае, когда позиции аминокислотных остатков из одной группы в последовательности, записанной в направлении C-N, совпадали с позициями аминокислотных остатков той же группы в последовательности, записанной в противоположном направлении. Отбор наиболее симметричных участков производили по максимуму отношения: «количество симметричных остатков в участке»/«длина участка».

Моделирование пространственной структуры пептидов *in silico*. Моделирование пространственной структуры пептидов осуществляли с помощью оригинальной программы, написанной на языке С с использованием программных пакетов GROMACS и SMMP. В основу программы положена концепция оптимизации по энергии с использованием генетических алгоритмов (ГА) (*Damsbo et al., 2004*). Программа написана на языке С и выполняется под операционной системой LINUX. Все использованные программы являются бесплатными для академических пользователей и находятся в свободном доступе в сети Интернет.

Докинг пептида ID. Мы проводили компьютерное моделирование образования олигомерных комплексов пептида **ID** с помощью программы Hex 4.5 (*Ritchie, Kemp, 2000*), осуществляющей докинг. Мы проводили расчеты с учетом электростатических взаимодействий между атомами. Докинг осуществляли по следующей схеме: моделировали взаимодействие двух объектов (моно- или олигомеров пептида), затем полученную структуру оптимизировали по энергии с использованием коммерческого пакета программ Hyper Chem 7.01. Оптимизированную структуру использовали на следующем шаге моделирования только в том случае, когда суммарная энергия составляющих его частей была выше, чем энергия оптимизированного образовавшегося олигомера (с учетом энергии гидратации). Таким образом мы избегали появления энергетически невыгодных структур и выбирали только пути олигомеризации, проходящие через энергетически выгодные стадии.

Приготовление препаратов фибрилл пептидов. 5 мг пептида **WT** или **ID** растворяли в 1 мл дистиллированной воды в пробирке типа «Эппендорф» объемом 1.5 мл и инкубировали 24 часа при температуре 55˚С при постоянном перемешивании.

Приготовление проб для измерения флуоресценции комплексов образцов с тиофлавином Т. Измерение флуоресценции комплексов тиофлавина Т (ThT) с фибриллами проводили по методу, описанному (*Le Vine, 1993*). Регистрацию спектров флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра AvaSpec-2048 или спектрофлуориметра PTI.

Электронная микроскопия фибрилл. Подготовку препаратов для электронной микроскопии осуществляли по стандартной методике негативного контрастирования. Исследования проводили на электронном микроскопе JEOL JEM 100S или TESLA BS100 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Измерение ферментативной активности лизоцима. Активность лизоцима определяли по стандартному методу (*Parry et al., 1965*). В качестве субстрата использовали препараты клеточной стенки *M. luteus*.

Получение фибрилл лизоцима и альфа-лактальбумина. Фибриллы лизоцима получали следующим образом: 10-28 мг лизоцима растворяли в 0.5 мл дистиллированной воды, добавляли 2М раствор NaCl и 1 М Gly-HCl буфер pH 2.0 до концентраций 0.1 М и 0.5 М соответственно. Конечная концентрация лизоцима составляла 5-14 мг/мл. Пробу инкубировали при 55^{0}С при постоянном перемешивании в течение 5 суток. Фибриллы АЛ получали по методу, описанному (*Goers et al., 2002*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зеркально-симметричные мотивы в последовательностях фибриллогенных пептидов. Одной из задач исследование являлось определение амилоидогенных детерминант АЛ человека и лизоцима куриного яйца. Информация о расположении таких участков в последовательности белков может послужить основой для создания пептидных ингибиторов образования токсичных префибриллярных форм и фибриллогенеза этих белков. Мы провели поиск особенностей первичной структуры известных фибриллогенных пептидов с целью выявления сходных особенностей в последовательностях АЛ и лизоцима.

Зеркально-симметричный мотив в последовательности транстиретина (TTR). В экспериментах по изучению фибриллогенеза TTR, выполненных ранее в нашей лаборатории было показано, что ограниченный протеолиз, ведущий к утрате С-концевого фрагмента 111-127 приводит к потере данным белком способности к фибриллогенезу. Гидролиз пептидной связи после 110 а.о. также приводит к утрате целостности участка TTR 105-115. Искусственный пептид, соответствующий этому участку, способен к фибриллогенезу *in vitro*

(*Jaroniec et al., 2002*) Последовательность пептида 105-115 TTR приведена на рис. 1A. Положение сайта, по которому происходит отщепление, показано звездочкой. Место расщепления пептидной связи располагается близко к центру фибриллогенного пептида, поэтому мы сделали предположение о том, что для фибриллогенеза важно наличие его C-концевого (111-115) участка. Обнаруженной нами особенностью первичной структуры пептида 105-115 TTR является то, что участок 105-114 зеркально-симметричным мотивом (ЗСМ) (рис. 1B). ЗСМ представляет собой фрагмент аминокислотной последовательности, содержащий центр симметрии, на равном расстоянии от которого по направлению к N- и C-концу находятся идентичные или близкие по гидрофобности а.о.

```
A
                    105_YTIAAL*LSPYS_115
B
TTR_105-115_N-C      105_YTIAA+LLSPYS_115
TTR_105-115_C-N     115_SYPSLL+AAITY_105
                          *  :: ::  *
```

Рисунок 1. A. Положение сайта гидролиза в последовательности фибриллогенного пептида 105-115. B. Мотив зеркальной симметрии в пептиде 105-115 TTR. (*) – обозначены совпадающие остатки, (:) - одинаковые по заряду/гидрофобности, (.) – совпадающие по полярности. Знаком + обозначен центр симметрии. Далее, если это не оговорено особо, цветовые обозначения сохраняются и для поиска гомологии используется программа CLUSTAL X (1.83).

Гидролиз пептидной связи после 111 а.о. приводит к утрате симметрии в этом фрагменте. Мы сделали предположение, что именно нарушение симметрии во фрагменте 105-115 является критичным для фибриллогенеза TTR.

Зеркально-симметричный мотив в последовательности фибриллогенного пептида из лизоцима фага T4. Наличие ЗСМ обнаружено нами также и в некоторых других естественных и синтезированных фибриллогенных пептидах. Так, ЗСМ присутствуют в последовательности фибриллогенного пептида (11-36) из лизоцима фага T4 (*Liu et al., 2004*). На рис. 2 представлен ЗСМ (11-31), присутствующий в этом пептиде.

```
                                             +
T4LYZ_N-C                    11_EGLRLKIYKDTEGYYIIGIGH_31
T4LYZ_C-N                    31_HGIGIIYYGETDKYIKLRLGE_11
                                .*: :  * :*: *  : :*.
```

Рисунок 2. Расположение мотива зеркальной симметрии в последовательности фибриллогенного пептида из лизоцима фага T4.

Пептид KFFEAAAKKFFE. π-π -стэкинг и ионные взаимодействия. На рис.3 представлена последовательность неприродного фибриллогенного пептида KFFEAAAKKFFE, описанного в работе (*Makin et al., 2005*). Мы обнаружили, что он также содержит ЗСМ

```
AB1_N-C_        KFFEAAAKKFFE
AB1_C-N_        EFFKKAAAEFFK
                :**: ** :**:
```

Рисунок 3. ЗСМ в последовательности фибриллогенного пептида, описанного в работе (*Makin et al., 2005*).

В работе (*Makin et al., 2005*). было показано, что основными взаимодействиями, стабилизирующими структуру фибриллы, являются водородные связи между антипараллельными бета-тяжами, ориентированными перпендикулярно оси фибриллы. Отдельные пачки бета-тяжей взаимодействуют между собой за счет π-π взаимодействий между фенилаланинами на концах пептида. Предполагается, что взаимодействия между боковыми цепями а.о. приводят к сближению азотов и кислородов пептидных связей мономеров и таким образом способствуют образованию водородных связей между отдельными бета-тяжами

Гидрофобные аминокислотные остатки в ЗСМ. В работе (*Sedman et al., 2005*) описан минимальный фибриллогенный фрагмент амилина (SNNFGAILSS). Мы обнаружили, что он также содержит ЗСМ, однако не содержит заряженных остатков (рис. 4). По-видимому, в фибриллогенезе такого пептида играет роль взаимодействие между гидрофобными остатками. Роль периодического расположения гидрофобных остатков и симметрии их расположения в фибриллогенезе фрагментов бета-амилоидного пептида обсуждается в работах (*Tjernberg et al., 2002; Wang, Hecht, 2002*).

```
Iappmin_C-N        53_SNNFG+AILSS_62
Iappmin_N-C        62_SSLIA+GFNNS_53
                       *. :. .: .*
```

Рисунок 4. Зеркально-симметричный мотив в последовательности фибриллогенного пептида из амилина.

Другим примером участия гидрофобных остатков в формировании фибрилл является искусственный амилоидогенный пептид, соответствующий консервативному участку прионных белков млекопитающих AGAAAAGA (*Gasset et al., 1992*). Такой пептид состоит только из гидрофобных остатков и является полностью зеркально-симметричным (рис. 5).

```
prP_N-C        AGAA+AAGA
prP_C-N        AGAA+AAGA
               **** ****
```

Рисунок 5. Зеркально-симметричный фибриллогенный пептид, соответствующий консервативному участку прионов млекопитающих.

Позднее было показано (*Norstrom, Mastrianni, 2005*), что наличие такого симметричного гидрофобного участка в прионном белке является необходимым для индукции фибриллогенеза при заражении хомячка прионным белком.

Полярные аминокислоты в ЗСМ. С другой стороны, известна пространственная структура гидрофильного фибриллогенного пептида, гомологичного фрагменту прионного белка дрожжей (рис. 6) (*Nelson et al., 2005*). В центре такого пептида располагаются полярные аминокислотные остатки. Взаимодействия между аминокислотными остатками, обусловливающие фибриллогенез этого пептида, схематически представлены на рисунке 6. Пептид также содержит ЗСМ.

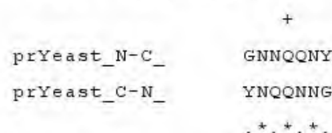


Рисунок 6. Симметрия в фибриллогенном пептиде, гомологичном участку прионного белка дрожжей.



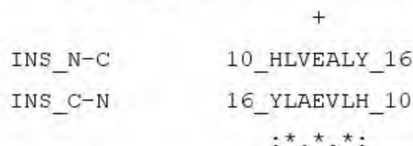
Рисунок 7. Схема обусловливающих фибриллогенез взаимодействий между аминокислотными остатками пептида GNNQQNY. Молекулы пептида в составе фибрилл располагаются параллельно – и происходит взаимодействие между боковыми остатками, выделенными на левой части рисунка. Такие стопки параллельно расположенных молекул способны взаимодействовать также (со сдвигом на 1 аминокислотный остаток) между собой. Звездочками (*) обозначены связи между боковыми цепями аминокислотных остатков (по Nelson et al., 2005).

Полиаминокислоты. Существуют, по крайней мере, два заболевания, патогенез которых связан с обусловливающими их возникновение аномальным фибриллогенезом гомоаминокислотных участков в последовательностях белков – это болезнь Хантингтона (возникновение полиглутаминового участка) и окулофарингеальная миодистрофия (возникновение полиаланинового участка). Кроме того, способность образовывать фибриллы *in vitro* показана для полилейцина, полиглутаминовой кислоты и полилизина (*Fandrich, Dobson, 2002*).

Заключение. Роль зеркально-симметричных участков во взаимодействии белков была впервые показана в работе Шпакова (*Шпаков, 1998*).Приведенные выше данные привели нас к гипотезе о роли зеркально-симметричных мотивов в фибриллогенезе некоторых белков и пептидов. Поэтому для выполнения задачи поиска амилоидогенных детерминант альфа-лактальбумина и лизоцима мы провели поиск зеркальной симметрии в аминокислотных последовательностях этих белков.

Предсказание фибриллогенной детерминанты инсулина. Мы создали компьютерную программу для поиска мотивов зеркальной симметрии в протяженных аминокислотных последовательностях и провели такой поиск в последовательностях белков и пептидов с

неизвестными фибриллогенными детерминантами. При анализе первичной структуры инсулина нами был обнаружен максимально симметричный пептид (10-16) в цепи В этого белка. Структура такого мотива представлена на рис. 8.



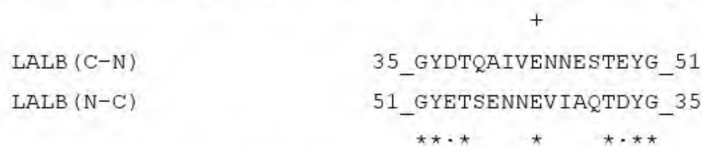
```
                        +
INS_N-C         10_HLVEALY_16
INS_C-N         16_YLAEVLH_10
                     :*.*.*:
```

Рисунок 8. Структура ЗСМ (10-16 а.о.) в цепи В инсулина.

Позднее в работе (*Gibson, Murphy, 2006*) было показано, что данный фрагмент является фибриллогенной детерминантой инсулина. На основании этих данных авторами был создан пептидный ингибитор фибриллогенеза, представляющий собой такой пептид с добавлением 5 аргининовых остатков с N-конца.

Определение потенциальных амилоидогенных детерминант в последовательности альфа-лактальбумина.

ЗСМ в последовательности АЛ. Мы провели поиск ЗСМ в последовательностях АЛ человека. На рис. 9 приведен наиболее симметричный участок в последовательности АЛ.



```
                                  +
LALB(C-N)          35_GYDTQAIVENNESTEYG_51
LALB(N-C)          51_GYETSENNEVIAQTDYG_35
                        **:*.    *    .*:**
```

Рисунок 9. Наиболее симметричный участок в последовательности АЛ человека.

Для изучения фибриллогенных свойств участка 35-51 АЛ человека такой пептид был синтезирован, и были изучены его фибриллогенные свойства.

Фибриллогенез пептида 35-51 АЛ. При электронной микроскопии пептида, идентичного участку 35-51 АЛ человека (пептид **WT**), инкубировавшегося в условиях для фибриллогенеза АЛ, наблюдали сорбировавшиеся на подложке филаменты толщиной около 10 нм (рис. 10).

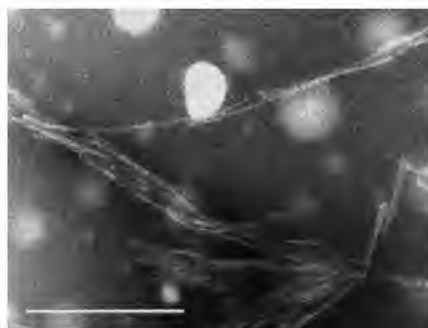


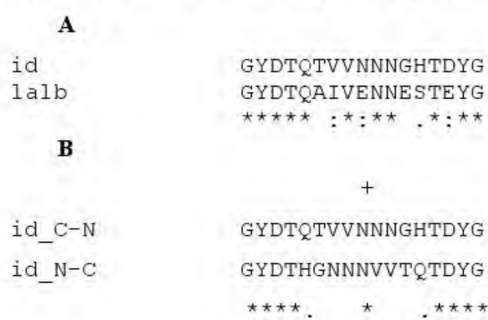
Рисунок 10. Результаты электронной микроскопии фибрилл пептида WT. Прямоугольник в левом углу соответствует 1 мкм. Наблюдаются как отдельные фибриллы, так и пучки фибрилл.

Опыты по измерению флюоресценции ThT показали, что такие фибриллы способны увеличивать квантовый выход флуоресценции этого красителя, что является свойством, характерным именно для аномальных фибрилл. Наличие фибрилл также было подтверждено с помощью АСМ.

Индукция фибриллогенеза. Было показано, что фибриллы пептида **WT** способны индуцировать фибриллогенез АЛ, что свидетельствует о присутствии в его последовательности фибриллогенной детерминанты этого белка.

Создание пептида на основе первичной структуры симметричного участка бета-домена альфа-лактальбумина.

Для изучения роли симметричных фрагментов в фибриллогенезе пептида **WT** и АЛ был синтезирован пептид, GYDTQTVVNNNGHTDYG, обладающий зеркальной симметрией и гомологичный пептиду **WT** (рисунок 11).



```
    A
id            GYDTQTVVNNNGHTDYG
lalb          GYDTQAIVENNESTEYG
              ***** :*:** .*:**
    B
                      +
id_C-N        GYDTQTVVNNNGHTDYG
id_N-C        GYDTHGNNNVVTQTDYG
               ****.   *   .****
```

Рисунок 11. (А) Выравнивание последовательностей участка 35-51 ЛА и пептида ID. (В) ЗСМ в пептиде ID.

Последовательность пептида **ID** отличается шестью аминокислотными остатками от соответствующего участка последовательности альфа-лактальбумина человека, причем замены а.о. с существенно отличающимися свойствами проведены в центральной его части.

В качестве первого этапа проверки наличия потенциальной способности такого пептида к фибриллогенезу мы провели компьютерное моделирование его пространственной структуры.

Моделирование пространственной структуры пептида ID in silico. Для моделирования пространственной структуры пептида **ID** *in silico* мы использовали оригинальную программу, использующую методы молекулярной механики и концепцию генетических алгоритмов. Такой выбор был обусловлен несколькими причинами: (i) Использование метода генетических алгоритмов позволяет решить проблему «нулевого приближения», то есть при использовании нашей программы конформация, получающаяся после оптимизации, не зависит от конформации, заданной в качестве начальной; (ii) Созданная нами программа позволяла оптимизировать пространственную структуру пептида с учетом энергии гидратации; (iii) Сравнение значения энергий, вычисленных для структур,

оптимизированных с помощью нашей программы и с помощью нескольких коммерческих пакетов программ показало, что полученная с помощью нашей программы структура имеет минимальную энергию. В результате моделирования мы получили структуру пептида, обладающую минимальной энергией и минимальной гидрофобной поверхностью.

Моделирование образования фибрилл пептида ID in silico. При взаимодействии белков существует большое количество факторов, влияющих на этот процесс, причем некоторые факторы, остающиеся за рамками используемой модели, могут играть определяющую роль. Поэтому важно отметить, что, несмотря на достоинства методов моделирования взаимодействий *in silico*, данные, полученные при проведении таких экспериментов, всегда следует использовать только в качестве исходных предположений при планировании экспериментов *in vitro* (*Villoutreix, 2001*).

Некоторые конформации пептида ID, полученные в процессе моделирования, *in silico* были способны к образованию фибриллоподобных агрегатов. При этом энергетически выгодным являлось взаимодействие между димерами пептидов приводящее к образованию тетрамеров. При дальнейшей олигомеризации структурами, участвующими в формировании фибриллы, являлись окта- и 16-меры пептида. 16 –меры были способны к взаимодействию между собой за счет гидрофобных контактов между остатками V7 и V8, боковые цепи которых оказываются снаружи 16-мера (рисунок 12). Таким образом 16-меры были способны объединяться с образованием линейной структуры толщиной около 7 нм.



Рисунок 12. Результаты компьютерного моделирования образования 16-мера пептида.

Сравнение энергий взаимодействия олигомеров, полученных в результате докинга, показало, что наиболее стабильными являются тетра- и октамеры пептида. Таким образом, в результате компьютерного моделирования фибриллогенеза пептида ID мы получили следующие результаты: (i) Пептид способен образовывать фибриллярные структуры толщиной около 7 нм; (ii) Взаимодействия между С-концевыми участками молекул пептида являются критичными для образования димеров; (iii) Взаимодействия между симметричными N- и С- концевыми участками молекул пептида являются критичными для образования тетрамеров; (iv) Наиболее стабильными олигомерами являются тетрамеры пептида; (v) Наиболее энергетически выгодной последовательностью событий при

фибриллогенезе пептида является последовательное образование ди-, тетра-, окта- и 16 меров. 16- меры пептида способны взаимодействовать, в основном, за счет гидрофобных взаимодействий.

Фибриллогенез пептида ID .При электронной микроскопии пептида, инкубировавшегося в течение суток в условиях для фибриллогенеза, было выявлено, что на углеродной подложке сорбировались протофиламенты толщиной около 10 нм (рисунок 13).

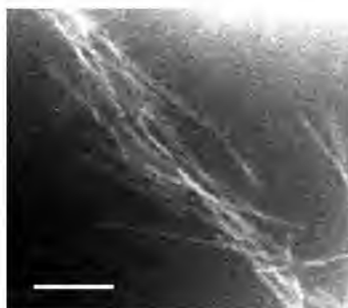


Рисунок 13. Результаты электронной микроскопии образцов, содержащих пептид ID Белый прямоугольник в правом углу соответствует 200нм.

Также наличие фибрилл было подтверждено с помощью АСМ. Наблюдаемая толщина протофиламентов совпала с толщиной фибриллярных структур, образование которых было предсказано в экспериментах *in silico*.

Устойчивые к SDS олигомеры в составе фибрилл пептида ID. Для выявления олигомеров, являющихся элементарными структурными единицами фибрилл, был проведен денатурирующий электрофорез проб, содержащих фибриллы пептида. Наблюдались мажорные зоны, соответствующие по электрофоретической подвижности 7-7.5 кДа (рисунок 14). Кроме того, наблюдались минорные зоны, соответствующие большему молекулярному весу. Положение минорных зон варьировало в зависимости от срока фибриллогенеза.



Рисунок 14. Электрофоретическое разделение компонентов фибрилл пептида в присутствии SDS. На дорожке 1 – коммерческий маркер SIGMA,. Молекулярные массы, соответствующие зонам на дорожке 3, вычислены с помощью программы Total Lab120. Они соответствуют тетрамерам, 32, 40- и 47-мерам пептида.

Интересен тот факт, что в случае, когда предварительного кипячения пробы в SDS не производилось, наблюдалось уменьшение интенсивности зоны, соответствующей тетрамерам. Это свидетельствует в пользу того, что SDS способствует диссоциации фибрилл, образованных пептидом, на низкомолекулярные составляющие, так как большая часть материала всегда оставалась у входа в лунку. При кипячении пробы с формамидом не выявлялись зоны, соответствующие молекулярной массе порядка 7 кДа, но наблюдалось появление зоны, соответствующей молекулярной массе 2 кДа, что соответствует молекулярной массе мономера пептида (данные не показаны). Устойчивость компонентов амилоидных фибрилл к кипячению с SDS обсуждается в работе (*Ventura, 2005*) как свойство, характерное именно для аномальных фибриллярных агрегатов. В работе (*Крындушкин и др., 2002*) при изучении прионного белка было показано, что под воздействием SDS агрегаты, образующихся при фибриллогенезе прионного белка, распадаются на олигомеры, состоящие в среднем из 4-20 молекул Sup35. Наличие устойчивых к SDS тетрамеров свидетельствует о различии энергии взаимодействий, обусловливающих существование тетрамеров и олигомерных форм более высокого порядка. Важно отметить, что в компьютерной модели в формировании тетрамеров пептида определяющим является взаимодействие между N- и C-концевыми зеркально-симметричными участками пептида, что косвенно свидетельствует в пользу роли ЗСМ в начальных этапах фибриллогенеза.

Влияние пептида ID на фибриллогенез АЛ. Для проверки соответствия амилоидогенных детерминант альфа-лактальбумина и пептида ID были проведены эксперименты по индукции фибриллогенеза альфа-лактальбумина фибриллами этого пептида.

В предварительных экспериментах было показано, что инкубация альфа-лактальбумина в концентрации 7 мг/мл в PBS-буфере при 55°С не приводила ни к фибриллогенезу, ни к агрегации белка (данные не показаны). При добавлении 10 мкл водного раствора пептида ID в концентрации 3 мг/мл к 1 мл такого раствора через два часа инкубации при 55°С наблюдали возникновение опалесценции, что свидетельствовало об агрегации альфа-лактальбумина. Такие агрегаты были способны увеличивать флюоресценцию тиофлавина Т, что указывало на способность пептида индуцировать фибриллогенез и, следовательно, на наличие в его структуре фибриллогенных детерминант альфа-лактальбумина. Однако наблюдаемая величина флюоресценции была в 30 раз ниже, чем величина флюоресценции, вызываемой фибриллами, образовавшимися из альфа-лактальбумина в той же концентрации в условиях для фибриллогенеза. Это отличие могло быть связано как с разницей в количестве фибрилл, так и с разницей в их структуре. Для изучения структуры агрегатов мы провели атомную силовую микроскопию образцов лактальбумина, подвергшегося инкубации при 55°С в присутствие пептида ID. Наблюдали как протяженные фибриллярные

агрегаты, так и сеть коротких фибриллярных агрегатов (рисунок 15), напоминающих центры роста фибрилл.

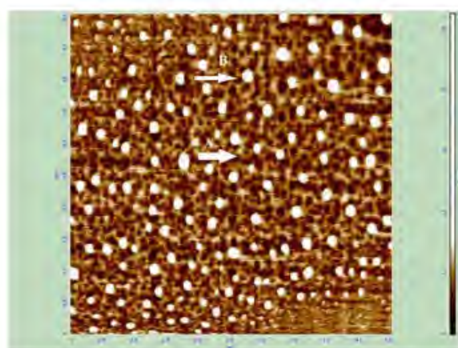


Рисунок 15. Сеть коротких фибриллярных агрегатов, наблюдавшаяся в пробе лактальбумина , подвергшегося инкубации при 55°С в присутствие пептида ID.

Для изучения обусловливающих агрегацию взаимодействий пептида ID и альфа-лактальбумина мы провели гель-фильтрацию супернатанта, полученного после центрифугирования раствора лактальбумина, подвергшегося инкубации при 55°С в присутствие пептида ID в течение суток. Положение пика при гель-фильтрации образца совпадало с положением пика миоглобина лошади (18 кДа), использовавшегося для калибровки колонки. При этом полностью исчезал пик, соответствующий мономеру альфа-лактальбумина (14.2 кДа) (рисунок 16). Молекулярная масса 18 кДа соответствует комплексу молекулы альфа-лактальбумина с двумя молекулами пептида.

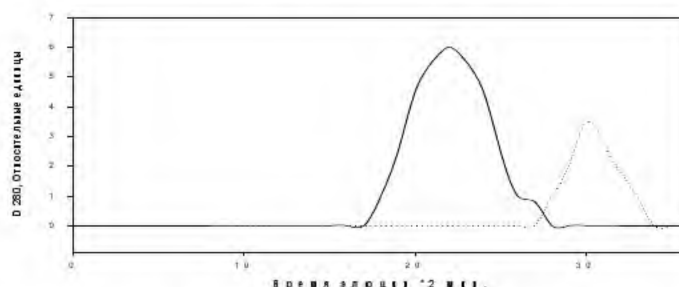
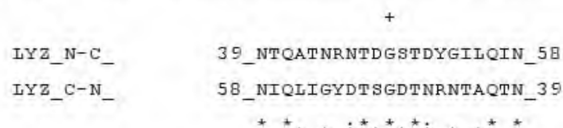


Рисунок 16. Хроматограмма гель-фильтрации альфа-лактальбумина (прерывистая линия) и альфа-лактальбумина, инкубировавшегося с пептидом (сплошная линия).

По литературным данным (*Xu et al., 2005*), димер альфа-лактальбумина быка является минимальной префибриллярной формой этого белка, обладающей цитотоксическим действием. Способность двух молекул пептида ID образовывать комплекс с молекулой альфа-лактальбумина позволяет предположить возможность создания ингибитора токсичности префибриллярных форм альфа-лактальбумина на основе пептида ID.

Механизм участия зеркально-симметричного пептида в фибриллогенезе лизоцима.

Мотив зеркальной симметрии в последовательности лизоцима. Поиск мотивов зеркальной симметрии в последовательности лизоцима куриного яйца привел нас к обнаружению такого мотива в бета-домене этого белка (рисунок 17).



```
                                  +
LYZ_N-C_        39_NTQATNRNTDGSTDYGILQIN_58
LYZ_C-N_        58_NIQLIGYDTSGDTNRNTAQTN_39
                   * *. . :*.*.*: . .* *
```

Рисунок 17. Расположение зеркально-симметричного мотива в бета-домене лизоцима.

Гипотеза о роли симметрии в фибриллогенезе протяженных пептидов. В настоящее время единственным протяженным (более 15 а.о.) пептидом, для которого известна пространственная структура в составе фибрилл, является бета-амилоидный пептид. На рисунке 18 представлены структуры протяженных фибриллогенных пептидов в составе лизоцима фага T4 и лизоцима куриного яйца, а также структура симметричного фрагмента 35-51 из лактальбумина. Интересно, что и эти фрагменты в составе белка, и бета-амилоидный пептид в составе фибрилл представляют собой структуру типа шпильки, причем между половинами зеркально-симметричных мотивов располагается бета-изгиб.

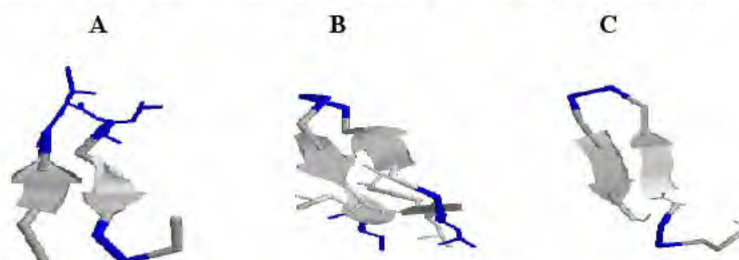


Рисунок 18. Структура фибриллогенных пептидов в составе лизоцима куриного яйца (A) и фага T4 (B) и структура симметричного фрагмента 35-51 в составе альфа-лактальбумина (C). Темным обозначены бета-изгибы.

Мы предложили гипотезу о роли протяженных зеркально-симметричных мотивов, образующих структуры типа шпильки в фибриллогенезе. На рисунке 19 представлена предполагаемая схема такого участия. Данные, полученные Luhrs и соавторами (*Luhrs et al., 2005*) относительно структуры бета-амилоидного пептида в составе фибрилл, согласуются с этой гипотезой.

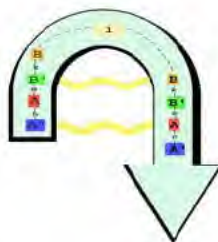
На основании гипотезы о роли протяженных зеркально-симметричных мотивов, образующих структуры типа шпильки в фибриллогенезе мы предложили структуру пептида, потенциально способного влиять на фибриллогенез лизоцима куриного яйца. Пептид представляет собой половину симметричного мотива и, согласно нашей гипотезе, способен конкурировать с молекулой лизоцима за место присоединения следующего мономера при образовании олигомерных предшественников фибрилл (Рисунок 20).

1.Общая структура зеркально-симметричных мотивов.



n,m,k,l –число аминокислотных остатков, способное обеспечивать необходимую взаимную ориентацию боковых цепей аминокислотных остатков; в составе участка l – последовательность аминокислотных остатков, склонная к образованию бета-изгиба; A,B –произвольные аминокислотные остатки; A',B'- аминокислотные остатки, боковые цепи которых способны взаимодействовать с боковыми цепями остатков A и B соответственно. Обозначенные жирным шрифтом аминокислотные остатки могут быть идентичными или сходными по свойствам с остатками слева от центра симметрии.

2.Внутримолекулярные взаимодействия, обусловливающие структуру мотива.



3. Возможные межмолекулярные взаимодействия, обусловленные структурой зеркально-симметричного мотива.



Рисунок 19. Схема участия ЗСМ в фибриллогенезе Синим и красным цветом обозначены зеркально-симметричные мотивы, принадлежащие разным молекулам. Светлым обозначены внутримолекулярные связи, темным – межмолекулярные.

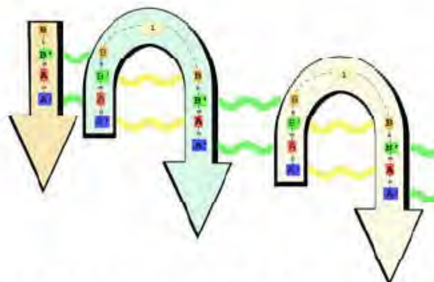


Рисунок 20. Присоединение пептида, являющегося половиной симметричной структуры.

В случае участия зеркально-симмеричных мотивов в фибриллогенезе такое взаимодействие может препятствовать образованию обычных префибриллярных форм, обладающих цитотоксическим действием. Нашей задачей являлось исследовать влияние пептида, являющегося половиной зеркально-симметричного мотива, на фибриллогенез лизоцима.

Изучение влияния пептида NTQATNRNTD на фибриллогенез лизоцима куриного яйца. Для исследования роли зеркально-симметричного мотива лизоцима в начальных этапах фибриллогенеза, мы провели инкубацию лизоцима в минимальной фибриллогенной концентрации совместно с десятикратным мольным избытком пептида HALF являющимся половиной зеркально-симметричной структуры в последовательности этого белка.. Инкубацию проводили в течение времени, недостаточного для образования фибрилл (около 2 часов). В качестве контроля использовали такую же пробу без добавления пептида. Результаты электрофореза в кислых условиях представлены на рисунке 23. Различие электрофоретической подвижности образцов свидетельствует в пользу образования комплекса между лизоцимом и пептидом.



Рисунок 21. Результаты электрофореза в кислых условиях лизоцима, инкубировавшегося в условиях для фибриллогенеза в присутствие (дорожка 1) и в отсутствие (дорожка 3) пептида HALF. На дорожку 2 был нанесен пептид в концентрации, присутствующей в пробе.

Докинг пептида и молекулы лизоцима. Для определения сайта присоединения пептида HALF к молекуле лизоцима, мы провели компьютерное моделирования взаимодействия лизоцима и пептида. Результаты моделирования свидетельствовали о том, что наиболее энергетически выгодным расположением молекулы пептида является расположение вблизи зеркально-симметричного мотива. Присоединение молекулы пептида приводило к возникновению стерического препятствия вблизи ферментативного центра белка (*Филлипс, 1968*). Мы сделали предположение, что в случае соответствия экспериментов *in vitro* и *in silico* в присутствие пептида должно наблюдаться снижение ферментативной активности белка.

Влияние пептида HALF на ферментативную активность лизоцима. При проведении эксперимента по изучению влияния пептида на ферментативную активность лизоцима мы

наблюдали, что в присутствии десятикратного мольного избытка пептида снижается скорость гидролиза препарата стенок *M.luteus.*. Результаты эксперимента представлены на рисунке 24. Факт снижения ферментативной активности лизоцима косвенно свидетельствует в пользу наличия способности такого пептида присоединяться к зеркально-симметричному участку молекулы лизоцима.

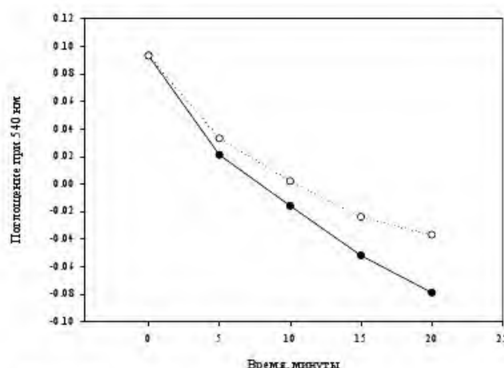


Рисунок 22. Влияние пептида HALF на ферментативную активность лизоцима. Непрерывная линия – белок в оптимальной концентрации, прерывистая – белок в той же концентрации в присутствие пептида.

Изучение влияния пептида на фибриллогенез лизоцима. В предварительных экспериментах с использованием методов атомной силовой микроскопии и изучения флюоресценции тиофлавина Т мы установили, что пептид **HALF** не способен образовывать фибриллы. На рисунке 25 (А) представлены результаты электронной микроскопии фибрилл лизоцима. На рисунке 25 (В) представлены результаты электронной микроскопии фибрилл лизоцима, образовавшихся в присутствие 10 – кратного мольного избытка (5 мг/мл) пептида. Пептид HALF в концентрации 5 мг/мл, инкубировавшийся в условиях для фибриллогенеза лизоцима, не был способен к образованию фибрилл (данные не представлены).

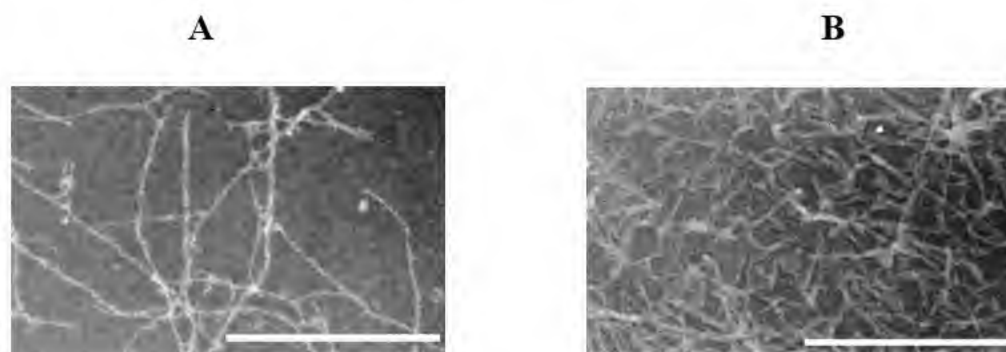


Рисунок 23. Фибриллы, образовавшиеся в отсутствие (А) и в присутствие (В) пептида. Длина серого прямоугольника соответствует 0.7 мкм.

Диаметр фибрилл, образовавшихся в присутствии пептида (около 10 нм), не отличался от диаметра фибрилл контрольного образца. Это свидетельствует о сходстве олигомерных

структур, образующих фибриллы в присутствие и отсутствие пептида. Однако наблюдались отличия в плотности расположения фибрилл на подложке (10±5 мкм$^{-2}$ в контрольном образце и 30±10 мкм$^{-2}$ в присутствие пептида) и в средней длине фибрилл (700±100 нм в контрольном образце, 300±50 нм в присутствие пептида). Важно отметить, что при электронной микроскопии фибрилл лизоцима, образовавшихся в отсутствие пептида, не наблюдали структур, сходных с представленными на рис. 25 (В). Это свидетельствует о том. что наблюдаемые морфологические отличия не связаны с неравномерностью сорбции образцов на поверхность подложки. Фибриллогенез лизоцима в исследованных образцах происходил в условиях, отличающихся только наличием или отсутствием пептида. Образцы для микроскопии готовились одновременно идентичным способом. Наблюдаемые отличия сохранялись при повторном проведении эксперимента, поэтому, исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о наличии влияния пептида NTQATNRNTD на образование фибрилл лизоцима. Такой пептид может быть использован в качестве основы для разработки эффективного ингибитора фибриллогенеза этого белка.

Заключение. Поиск ЗСМ в последовательностях модельных белков альфа-лактальбумина человека и лизоцима куриного яйца позволил определить участки, являющиеся потенциальными фибриллогенными детерминантами этих белков. Пептид GYDTQAIVENNESTEYG (WT), содержащий ЗСМ АЛ человека и GYDTQTVVNNNGHTDYG (ID), содержащий основные элементы ЗСМ этого белка, способны к фибриллогенезу. Пептидs WT и ID способны индуцировать фибриллогенез АЛ. При индукции фибриллогенеза АЛ пептидом ID комплексы АЛ с пептидом отличаются от описанных в литературе токсичных префибриллярных олигомеров альфа-лактальбумина. Пептид NTQATNRNTD (HALF), являющийся половиной ЗСМ лизоцима, способен связываться с этим белком и влияет на его фибриллогенез. Таким образом, ЗСМ в последовательностях альфа-лактальбумина и лизоцима играют роль в фибриллогенезе этих белков. Воздействие на ЗСМ с помощью пептидов является перспективной стратегией борьбы с возникновением токсичных олигомеров белков, возникающих в процессе фибриллогенеза.

ВЫВОДЫ

1. При компьютерном анализе первичной структуры семи известных фибриллогенных пептидов обнаружены зеркально-симметричные мотивы.
2. Зеркально-симметричный мотив в последовательности альфа-лактальбумина человека (GYDTQAIVENNESTEYG) содержит фибриллогенную детерминанту этого белка.

3. Зеркально-симметричный пептид ID (GYDTQTVVNNNGHTDYG), гомологичный зеркально-симметричному мотиву в последовательности альфа-лактальбумина человека, способен к фибриллогенезу.
4. Компьютерное моделирование фибриллогенеза пептида ID адекватно отражает фибриллогенные свойства пептида ID, наблюдающиеся *in vitro*.
5. Показано, что пептид ID индуцирует фибриллогенез альфа-лактальбумина человека. Пептид ID связывается с альфа-лактальбумином в соотношении 2:1.
6. Предложен механизм участия зеркально-симметричных мотивов в фибриллогенезе. На основании этой гипотезы разработан и синтезирован пептид, идентичный фрагменту бета-домена лизоцима. Показано влияние такого пептида на морфологию фибрилл лизоцима.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Egorov V.V.**, Solovyov K.V. Peculiarities of fibrillogenic proteins primary structure // ESHG Prague, Czech Republic, May 7-10, 2005, p.278, 2005;
2. Гармай Ю.П., **Егоров В.В.** Поиск симметричных мотивов в амилоидогенных белках // Материалы межвузовской научной конференции "XXXIV неделя науки СПбГТУ", СПб, изд-во СПбГТУ, с. 5, 2005;
3. **Егоров В.В.** Особенности первичной структуры амилоидогенных белков // тезисы доклада, 9-я пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология – наука XXI века"18-22 апреля 2005, с.18, 2005;
4. **Егоров В.В.** Симметричные аминокислотные последовательности и фибриллогенез // Вестник молодых ученых, Всероссийская конференция молодых исследователей 14-16 апреля 2005 года, Сборник материалов, СПб, с. 37, 2005;
5. **Егоров В.В**. Самокомплементарные мотивы в амилоидогенных белках // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины, Сборник тезисов научно-практической конференции молодых ученых, СПб, Издательский дом МАПО, с. 391, 2005;
6. **Егоров В.В.** Моделирование фибриллогенеза белков // тезисы доклада, 10-я Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология – наука XXI века" 17-21 апреля 2006, с. 17, 2006;
7. **Егоров В.В**., Брилинская Е.С., Гармай Ю.П., Моделирование in silico начальных стадий фибриллогенеза зеркально-симметричного пептида // тезисы доклада, Человек и его здоровье, Девятая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей, СПб, с. 107, 2006;
8. **Егоров В.В.**, Грудинина Н.А., Соловьев К.В. Влияние пептида NTQATNRNTD на аномальный фибриллогенез лизоцима // Исследовано в России, 9:2475-2481, http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2006/256.pdf2006, 2006;
9. Соловьев К.В., Гастева А.А., **Егоров В.В.,** Алейникова Т.Д., Сироткин А.К., Шварцман А.Л., Шавловский М.М. Роль С-концевого фрагмента трантиретина человека в аномальном фибриллогенезе // Биохимия 71(5): 672 – 680, 2006;